



流式样本制备全攻略



www.ptgcn.com



搜索一下

目录

CONTENTS

一、公司介绍	2
二、重组流式抗体介绍	4
三、流式细胞术实验方案设计	6
四、流式细胞术常见样本制备方法	7
1. 小鼠脾脏	7
2. 小鼠骨髓	8
3. 小鼠胸腺	9
4. 小鼠血小板	10
5. 小鼠腹腔巨噬细胞	11
6. 人 PBMCs	12
7. 悬浮细胞系	14
8. 贴壁细胞系	14
五、流式细胞术染色操作流程	15
1. 细胞表面蛋白检测方案	15
2. 细胞内蛋白检测方案	16
3. 转录因子检测方案	17
4. 磷酸化蛋白检测方案	18
5. T 细胞激活制备及检测方案	19
6. 巨噬细胞极化及检测方案	20

一、Proteintech 公司介绍

Proteintech 于 2001 年在美国芝加哥创立，是一家深度服务于生命科学研究及医学诊断领域的生物公司。其全球四大研发生产中心可提供抗体、重组蛋白、ELISA 试剂盒、实验试剂及高品质 CRO 技术服务；目前已获得 10000+ 企业及科研院所的认可，高效助力全球生命科学及医学诊断领域取得突破性成果。

免疫学研究生物试剂



抗体

- 兔多抗 / 小鼠单抗 / 羊驼纳米抗体
- 重组兔单抗 / 重组流式抗体 / 单链抗体 scFv
- 直标抗体 / 中和抗体 / 抗体组合
- 重组二抗 / 病理诊断抗体 / 空间组学抗体
- 抗体对 / CAR 检测抗体



试剂盒·Kits

- Speedy™ 一步法 ELISA 试剂盒
- 传统 ELISA 试剂盒 / 抗体对套装
- 抗体对 (PBS-Only)
- 多因子 CBA 检测试剂盒
- Active Motif® 表观研究试剂盒



重组蛋白

- Humankine® 天然活性蛋白
- HEK293/CHO 表达真核重组蛋白
- E.coli 表达重组蛋白
- Active Motif® 表观药物开发重组蛋白



实验试剂

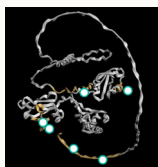
- WB/IP/IHC/IF/FC 等实验全套试剂
- 血清 / 培养基 / 冻存液 / 细胞活性检测
- 小分子化合物

共享创新与数据开放



行业首发：Able 生物科研智能体

2025 年 9 月，Proteintech 在官网上线 AI 助手 Able，这是行业内首款专为生命科学领域设计的人工智能实验助手，可在短短几秒钟内，为客户提供企业研发专家级别的协助，帮助研究人员解决从海量抗体库中筛选合适产品并优化实验方案的难题。



行业首家：3D 抗原表位图谱

2025 年 3 月，Proteintech 在官网上线 3D 抗原表位图谱 (3D Epitope Mapping)，成为行业第一家提供精确抗体 - 抗原结合位点信息的抗体供应商。这些精确的表位信息，能够提高抗体选择的效率和准确性，助力从基础科学研究到临床药物开发的各个阶段。

文献口碑

产品超过 45 万次 SCI 文献引用；1800 余次荣登顶尖期刊封面文章

全球四大研发中心



美国

芝加哥研发生产中心



美国

圣地亚哥研发生产中心



中国

武汉研发生产中心



德国

慕尼黑研发生产中心

CRO 技术服务

全人源抗体 开发

- 人单个 B 细胞和浆 B 细胞抗体发现
- 传染疾病，自身免疫性疾病，恶性肿瘤和其他人类疾病
- 与具有资质的机构和企业合作开发

抗体药物 开发

- 小鼠和兔抗体发现平台
- TCRm 抗体，抗体内化，抗体片段，抗体人源化
- 表位作图，亲和力排序，亲和力测定，EC50, IC50, 交叉结合

诊断及研究 抗体开发

- 兔和羊抗体发现平台
- 小分子抗体，修饰性抗体，抗独特性抗体
- 抗体对，IHC, WB, FC

抗体生产 服务

- 高通量重组抗体生产
- 大规模重组抗体生产

营销网络覆盖全球 快速响应

- 七大分公司及库存基地
- 提供产品定制服务
- 1-3天到货周期
- 24小时专业技术支持

全球 10000+ 企业及院所的认可

- 生物技术公司
- 体外诊断公司
- 创新药公司
- 疫苗公司
- 生物试剂公司
- CXO 公司
- 医美及化妆品公司
- 科研院所

质量管理体系认证

GMP 级别细胞因子及抗体：
严格执行 GMP 标准及
GMP 质量管理体系



ISO 9001



ISO 13485



重组流式抗体是基于 Proteintech 基于 ABCE™ 单个 B 细胞抗体发现平台开发出来的创新型产品，可提供 Fc 沉默，生物定点标记技术的 FcZero-rAb® 系列新型骨架以及 Uni-rAb™ 系列传统骨架重组流抗，同时可提供多种克隆类型，如高引用克隆重组化和全新克隆，覆盖更多靶点。另外，Proteintech 还提供用于纳米流式检测的单链抗体。

- ✔ 重组技术生产
- ✔ 大量稳定供应
- ✔ 靶标多样，改造灵活
- ✔ 可提供仅含 PBS 的抗体

1. 重组流式抗体产品类型丰富

1)	FcZero-rAb® 重组流式抗体	Fc沉默及生物定点定量标记双重技术
2)	Uni-rAb™ 重组流式抗体	覆盖靶标丰富，类型多样
3)	高引用克隆重组化流式抗体	高引用克隆抗原结合区与小鼠 IgG2a骨架重组
4)	全新克隆重组化流式抗体	更多新靶点，统一免抗骨架，仅需一种同型对照
5)	非人灵长类动物重组流式抗体	经过食蟹猴样本验证
6)	磷酸化蛋白检测流式抗体	经过内源性流式实验充分验证
7)	单链抗体scFv	适用于纳米流式检测/in vivo CAR
8)	羊驼纳米重组流式抗体	针对肿瘤免疫靶点的荧光染料偶联纳米抗体VHH

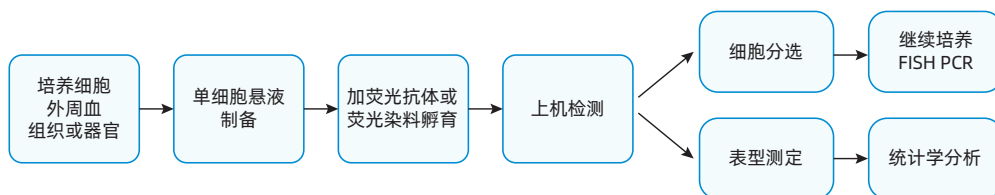
2. 重组流式抗体已经覆盖常用免疫细胞分型标志物（持续上新）

细胞类型 / 分类	人	小鼠
白细胞	CD45	CD45
造血干细胞	CD34, Lin(-), CD38(-), CD90	Lin(-), CD48(-), CD150, Sca-1, CD117
B 细胞	CD19, CD20	CD19, CD45R(B220)
T 细胞	CD3	CD3
活化 T 细胞	CD3, CD25, CD69	CD3, CD25, CD69
辅助性 T 细胞	CD3, CD4	CD3, CD4
Th1 细胞	CD3, CD4, IFN-γ	CD3, CD4, IFN-γ
Th2 细胞	CD3, CD4, IL-4	CD3, CD4, IL-4
Th9 细胞	CD3, CD4, IL-9	CD3, CD4, IL-9
Th17 细胞	CD3, CD4, IL-17	CD3, CD4, IL-17
Th22 细胞	CD3, CD4, IL-22	CD3, CD4, IL-22
调节性 T 细胞	CD3, CD4, CD25, Foxp3, CD127(low/-)	CD3, CD4, CD25, Foxp3
细胞毒性 T 细胞	CD3, CD8	CD3, CD8
树突状细胞	CD11c, CD83, CD141, CD209, MHC class II	CD11c, MHC class II
浆细胞样树突细胞	CD123, CD303, CD304	CD11c(int), CD317
自然杀伤细胞	CD16, CD56	NKp46, NK1.1(限品系), CD49b
单核细胞	CD14, CD16, CD64	CD11b, CD115, Ly-6C, Ly-6G(-)
巨噬细胞	CD14, CD68	CD11b, F4/80, CD68
M1 型巨噬细胞	CD80, CD86	CD80, CD86
M2 型巨噬细胞	CD163, CD206	CD163, CD206
巨核细胞 / 血小板	CD42b, CD62P	CD41, CD62P
红细胞	CD235a	TER-119
中性粒细胞	CD11b, CD15, CD16	CD11b, Ly-6G, Gr-1, CD115(-), Ly-6C(low/-)
嗜碱性粒细胞	2D7 antigen, CD117(-), CD123, CD203c, FcεR1a	CD200R3, FcεR1a
嗜酸性粒细胞	CD11b, CD193, EMR1, Siglec-8	CD11b, CD193, F4/80, Siglec-F
间充质干细胞	CD44, CD73, CD90, CD105	CD29, CD44, CD73, CD90, Sca-1, CD105
	CD11b(-), CD14(-), CD19(-), CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-)	CD11b(-), CD14(-), CD19(-), CD34(-), CD45(-)
内皮细胞	CD31, CD34, CD105, CD144	CD31, CD34, CD105, CD144

黑色字体为重组流抗，褐色字体为杂交瘤流抗，灰色字体即将上线

Proteintech可提供20余种荧光染料进行偶联，可完成12色的流式配色！

三、流式细胞术方案设计



▲流式细胞术实验的基本操作（以表面染色为例）

一、流式细胞术的方案设计

1. 实验前准备

1.1 实验前需了解所研究细胞的基本特性，包括细胞的大小、相关的特异性标志物以及标志物在细胞上的表达丰度和定位。

常见免疫细胞标志物见 P4

1.2 实验前需了解实验室流式细胞仪的配置，选择合适的荧光偶联抗体。

1.3 配色：多色流式通常需要设计配色方案。

- 低丰度或难以检测的靶标应该与荧光信号强的染料配对，
- 高丰度的靶标与中等或荧光信号弱的染料配对；
- 尽量避开相关性高的靶标使用通道之间有荧光溢漏的抗体来标记。

1.4 实验对照：多色流式中需要设置荧光补偿及荧光减一对照。其他设置同型对照（Isotype Control）即可。

空白对照 (Blank control)	未染色的细胞，用以区分细胞的背景荧光或自发荧光，避免假阳性的结果。可以用来调节各个通道的电压。
同型对照 (Isotype control)	使用与实验抗体相同种属来源、相同剂量及同种免疫球蛋白的相同亚型的抗体作为对照，用于区分抗体非特异性结合到细胞上而产生的背景荧光。
荧光减一对照 (Fluorescence minus one (FMO) control)	指用同种细胞，染上去掉一种荧光素的其它所有荧光素。评估荧光染料的相互干扰和补偿本底，有助于正确设门，是多色实验设门所必需的对照。
生物学对照 (Biological control)	除研究对象外，其他条件均保持一致的对照实验组，用来确定染色特异性和实验结果的可靠性，如检测刺激后抗原表达量，以未刺激的样本做对照。

2. 实验操作

整个实验过程都需要在冰上且避光进行，能较好的保证细胞活性和防止荧光偶联抗体上的荧光淬灭，使实验结果更可靠。

3. 上机

3.1 设置仪器电压遵循两点：

- 避免阴性信号过强，一般在坐标轴 10^3 之前；
- 阳性信号必须在仪器检测范围内，否则后续无法分析数据。

3.2 对于多色流式，需要利用单染管来测量补偿值。

3.3 收集细胞的数量没有严格的要求，但是对于稀有的细胞群，收集的细胞量大才有助于分析。

四、流式样本制备及检测步骤

在流式细胞术中，单细胞悬液制备是实验成功的关键步骤。良好的单细胞悬液样本中细胞活力高，死细胞、细胞碎片以及粘连体少，并且细胞表面抗原保留完整，这些因素最终决定了流式结果的好与坏。

小鼠脾脏单细胞悬液

- 1) 取出小鼠的脾脏，浸泡在 1×PBS (*PR20014) 缓冲液中。
- 2) 用镊子持取脾脏组织 45μm 细胞筛网上轻搓，亦可使用注射器活塞扁平端研磨，至没有明显的红色块状物即可。
- 3) 收集研磨液于 15 mL 离心管中，再用 1×PBS 缓冲液冲洗滤网，将冲洗液一并收到 15 mL 离心管中，4 °C 875×g 离心 5 min。

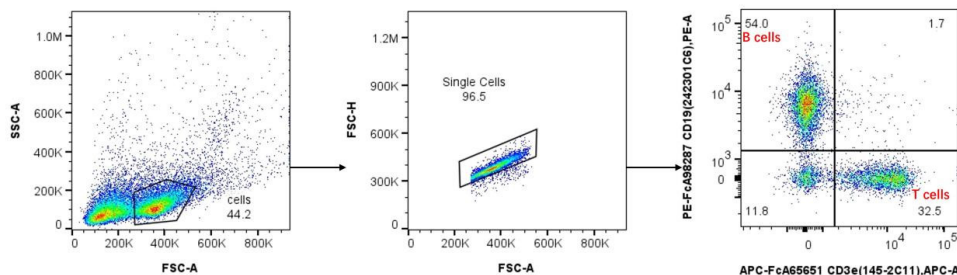
注：不同规格离心机有效半径存在差异，可根据公式换算离心力与转速： $G=1.11 \times 10^{(-5)} \times R \times (\text{rpm})^2$ 。

- 4) 弃掉上清，加入 4 mL 1×红细胞裂解液 (PF00015) 重悬细胞，室温裂解 5 min 后，立即加入 10 mL 1×PBS 缓冲液终止裂红，4°C 875×g 离心 5 min。
- 5) 弃掉上清，加入 5 mL 1×流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，4°C 875×g 离心 5 min。
- 6) 弃掉上清，加入 1×流式细胞染色缓冲液重悬细胞，用 200 目滤网过滤后计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个/mL。
- 7) 在 2mL 离心管中加入 100 μL 细胞悬液，再加入 0.5 μL MonoZero™小鼠 Fc 受体封闭剂 (PF00031)，轻轻混匀后于室温孵育 10 min 后加入适量流式抗体，继续孵育 35 min。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

- 8) 孵育结束后，用流式染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼小鼠脾脏T/B细胞流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群（图左）；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞（图中）；
- ③圈出T细胞（CD3e+CD19-）与B细胞（CD3e-CD19+）（图右）。

使用抗体：
Anti-Mouse CD19(242301C6)（货号：PE-FcA98287）；
Anti-Mouse CD3e(145-2C11)（货号：APC-FcA65651）。

注意事项

- A. 以小鼠自身左、右为标准，脾脏位于腹腔的左上方，形状呈长条形，质地软而脆，获取时需要小心，避免将其弄断，尽量将周围的脂肪组织去除干净；
- B. 研磨需充分，尽量收集较多的细胞；
- C. 脾脏组织血流丰富，需要充分裂红；
- D. 操作过程中，细胞均置于0-4 °C冰浴中，保证细胞活性。

*PR20014表示Proteintech的产品货号

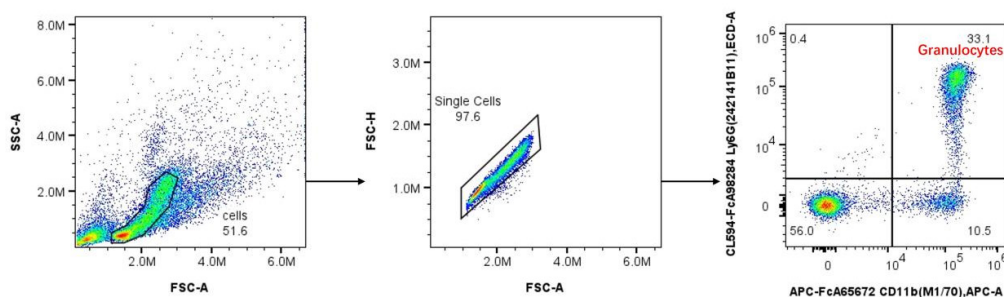
小鼠骨髓单细胞悬液

- 1) 用剪刀和镊子小心剪开小鼠腹部的皮肤，沿着后肢的方向剪开腿部的皮肤，之后再沿着脚踝环剪，将腿部皮肤完整的分离下来。
- 2) 小心剥离腿部肌肉，在关节处剪断，将股骨和胫骨尽可能完整的分离出来，放置于 1×PBS 缓冲液中 (PR20014)。
- 3) 剪开股骨和胫骨的两端，露出骨髓腔，用 10 mL 无菌注射器吸取 10 mL 1×PBS 缓冲液后换上 1 mL 无菌注射器针头，小心插入骨髓腔，缓慢推动注射器，将骨髓冲洗出来，重复 2-3 次，直至骨髓腔变为白色为止。
- 4) 冲洗结束后，用移液器将细胞团轻轻吹散，经 200 目滤网过滤，滤液收集到 15 mL 离心管中，4°C 875×g 离心 5 min。
- 5) 弃掉上清，加入 2 mL 1× 红细胞裂解液 (PF00015) 重悬细胞，室温裂解 5 min 后，立即加入 10 mL 1×PBS 缓冲液 (PF00018) 终止裂红，4°C 875 ×g 离心 5 min。
- 6) 弃掉上清，加入 5 mL 1× 流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，4°C 875 ×g 离心 5 min。
- 7) 弃掉上清，加入 1× 流式细胞染色缓冲液重悬细胞，用 200 目滤网过滤后计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个 /mL。
- 8) 在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 细胞悬液，进行流式染色。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

- 9) 孵育结束后，用 1× 流式细胞染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼小鼠骨髓粒细胞流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③圈出粒细胞 (CD11b+/Ly6G+) (图右)。

使用抗体：
 Anti-Mouse CD11b (M1/70) (货号：APC-FcA65672)；
 Anti-Mouse Ly6G (242141B11) (货号：CL594-FcA98284)

注意事项

- A. 完整分出小鼠的股骨和胫骨，避免骨头在中间断开造成骨髓的浪费；
- B. 将骨髓完全冲洗出来，至骨髓腔呈现白色半透明状态即可；
- C. 骨髓样本细胞分群明显，红细胞少于脾脏样本，因此裂解红细胞时，大约一只小鼠用1-2 mL红细胞裂解液即可，裂红时间不宜过长，一般不超过5 min；
- D. 操作过程中，细胞均置于0-4 °C冰浴中，保证细胞活性。

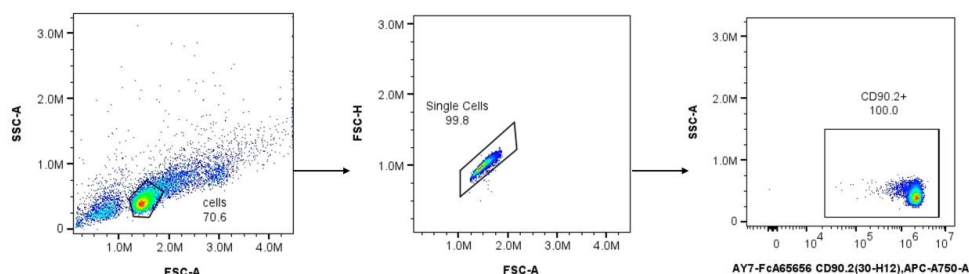
小鼠胸腺单细胞悬液

- 1) 用剪刀和镊子在胸骨位置剪开一个小口，由此小口撕裂皮肤暴露出胸骨。
- 2) 剪断心脏前方胸骨及两侧肋骨，由心脏上方的前纵隔内小心取出胸腺，浸泡在 1×PBS 缓冲液 (PR20014) 中。
- 3) 将胸腺置于 200 目的滤网上用镊子研磨充分至没有明显的块状物即可。
- 4) 收集研磨液于 15 mL 离心管中，再用 1×PBS 缓冲液冲洗滤网，将冲洗液一并收到 15 mL 离心管中，4°C 875×g 离心 5 min。
- 5) 弃掉上清，加入 1× 流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，用 200 目滤网过滤后计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个 / mL。
- 6) 在 2 mL 离心管中加入 100 μL 细胞悬液，进行流式染色。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

- 7) 孵育结束后，用 1× 流式细胞染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼小鼠胸腺T细胞流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③圈出CD90.2+细胞 (图右)。

使用抗体：
Anti-Mouse CD90.2 (30-H12) (货号：AY7-FcA65656)

注意事项

- A. 剪取胸腺时避免剪断周围血管，如果不小心中断，可以用 1×PBS 缓冲液将胸腺多漂洗几遍，去除红细胞干扰；
- B. 操作过程中，细胞均置于 0-4°C 冰浴中，保证细胞活性。

新一代流式抗体

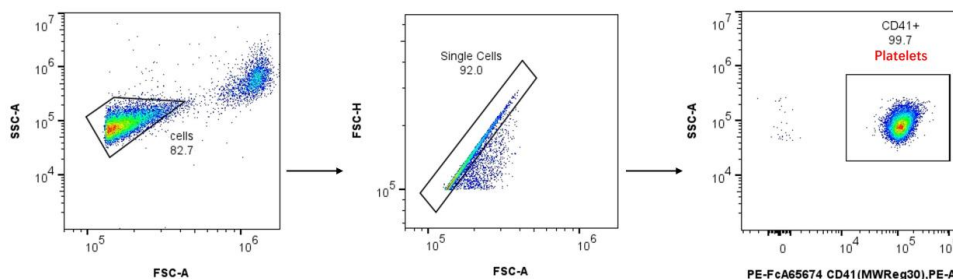
FcZero-rAb® 重组流抗 专利技术

- Fc 沉默，无需使用 Fc 受体封闭剂
- 定点标记，远离抗体活性中心
- 骨架相同，仅需使用一种亚型的同型对照

小鼠血小板

- 1) 左手抓住小鼠使其眼球突出，用镊子快速拔掉眼球，使其外周血流入含有 EDTA-K2 的抗凝管中（大约 500-600 μ L），轻轻晃动，让血液与抗凝剂完全接触。
- 2) 常温 150 \times g 离心 15 min，离心后分为三层，从下到上分别是红细胞层、血沉棕黄层（白细胞和血小板的混合层）和富血小板血浆层，小心吸取中间层和上层血浆部分于 1.5 mL 离心管中。
- 3) 常温 200 \times g 离心 10 min（进一步去除红细胞和白细胞），吸取上清（富血小板血浆）于 2 mL 离心管中，常温 861 \times g 离心 12 min，得到血小板沉淀。
- 4) 加入 1 \times 流式细胞染色缓冲液（PF00018）重悬细胞，备用。
- 5) 在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 细胞悬液，进行流式染色。
- 6) 孵育结束后，用 1 \times 流式细胞染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼小鼠血小板流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群（图左）；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞（图中）；
- ③圈出血小板（CD41+）（图右）。

使用抗体：
Anti-Mouse CD41 (MWReg30) (货号：PE-FcA65674)

注意事项

- A.小鼠眼球取血时应尽量避免接触到毛发，以免发生溶血，对实验结果产生影响；
- B.眼球取血结束后，将装有全血的抗凝管上下颠倒混匀，使血液与抗凝剂接触完全，避免产生血凝块；
- C.吸取血沉棕黄层和富血小板血浆层时应尽量避免吸到最下面的红细胞层，以免影响血小板的分离纯度；
- D.实验温度应该为室温，大约21 $^{\circ}$ C-24 $^{\circ}$ C，过热或者过冷都会导致血小板的活化。如果后续要对血小板进行其他处理，可在PBS缓冲液中加入避免血小板活化的前列腺素PGE1和三磷酸腺苷双磷酸酶。

MonoZero™ Fc受体封闭剂

Proteintech 的 MonoZero™ 系列 Fc 受体封闭剂以猪 IgG1 恒定区为骨架的嵌合抗体，能避免试剂与二抗的非特异性结合产生假阳性信号，细胞分群更清晰准确，尤其适配多色免疫表型分析这类对信号纯度要求高的实验。基于猪源蛋白与人类蛋白的生物相容性，相较于部分啮齿类来源的试剂，猪源骨架试剂对人体样本的刺激更小，能降低免疫干扰。

产品名称	货号	说明
MonoZero™ 人Fc受体封闭剂	PF00032	适用人源样本
MonoZero™ 小鼠Fc受体封闭剂	PF00031	适用小鼠源样本
MonoZero™ 人/小鼠三合一封闭剂	PF00029	适用人-鼠交叉检测 (共培养、混合样本、双物种抗体等)

小鼠腹腔巨噬细胞

1) 将腹腔巨噬细胞诱导剂 (PR40028) 3 天后的小鼠放入 75% 酒精中 5 min。

推荐使用 Proteintech 腹腔巨噬细胞诱导剂 (PR40028)。本产品注射至小鼠腹腔内可诱发巨噬细胞大量生成 (为天然状态下 3-10 倍)，且诱导的巨噬细胞活力旺盛，可减少实验动物用量，简化实验操作。

使用方法：

- 1、实验前从冰箱取出本产品至室温解冻备用。
- 2、成年实验小鼠经检疫饲养合格后 (小鼠品系根据实验需要选取)，每只小鼠腹腔注射本产品 1 mL (取前需摇匀)，注射完后继续饲养。
- 3、(可选) 为了提高巨噬细胞产量，可以在第二天再重复注射一次，再继续饲养。
- 4、最后一次注射后 60-72 小时左右，腹腔巨噬细胞数量即达到峰值且活力旺盛，即可处死小鼠取出细胞 (剪开腹膜、用培养基或缓冲液冲洗出巨噬细胞)，再进行后续实验。

2) 小鼠固定好后放置于超净工作台中，用剪刀和镊子小心剪开腹部皮肤。

3) 用 10 mL 无菌注射器吸取 5 mL 1×PBS 缓冲液 (含 0.3% 热灭活血清) 后换上 1 mL 无菌注射器针头，小心插入腹腔，缓慢推动注射器，之后小心揉动腹部，使液体在腹腔充分流动，停留 3-5 min 后将液体吸出至 15 mL 离心管中。(此步骤重复一次)

4) 4°C 875×g 离心 5 min，弃掉上清，用 10 mL DMEM 完全培养基 (Basic DMEM+10% 灭活 FBS+1% 双抗) 重悬细胞，转移到 10 cm 细胞培养皿中，在 37°C 5% CO₂ 的细胞培养箱中贴壁 5 hours。

5) 弃掉培养基，去除未贴壁的细胞，用 1×PBS 缓冲液 (PR20014) 洗去残余的培养基，加入 3 mL 胰酶 37°C 消化 1 min，加入 DMEM 完全培养基终止消化，用移液器反复均匀吹打培养皿底部，使贴壁细胞完全脱落下来。

6) 收集细胞悬液于 15 mL 离心管中，4°C 875×g 离心 5 min。

7) 弃掉上清，加入 5 mL 1×流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，4°C 875×g 离心 5 min。

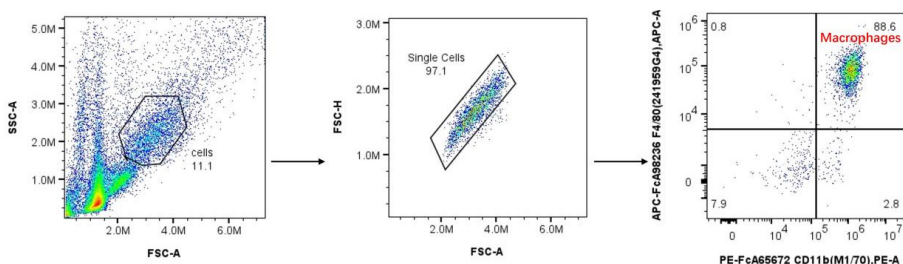
8) 弃掉上清，加入 1×流式细胞染色缓冲液重悬细胞，计数，将细胞浓度调整至 1×10⁷ 个 /mL。

9) 在 2mL 离心管中加入 100μL 细胞悬液，再加入 0.5 μL MonoZero™ 小鼠 Fc 受体封闭剂 (PF00031)，轻轻混匀后于室温孵育 10 min 后加入适量流式抗体，继续孵育 35 min。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

10) 孵育结束后，用 1×流式细胞染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼小鼠腹腔巨噬细胞流式染色数据分析



- ①通过 FSC-A/SSC-A 圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ②用 FSC-A/FSC-H 去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③圈出巨噬细胞 (CD11b+及 F4/80+) (图右)。

使用抗体：

Anti-Mouse CD11b (M1/70) (货号：PE-FcA65672)

Anti-Mouse F4/80 (241959G4) (货号：APC-FcA98236)

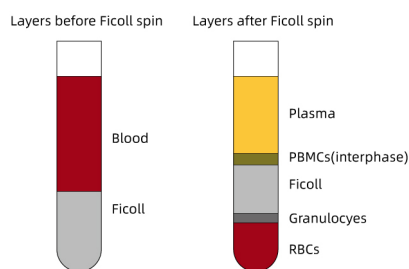
注意事项

- A. 剪开腹部皮肤时，不要将腹膜剪破；
- B. 用注射器向腹腔注射 1×PBS 缓冲液时，不要扎到附近脏器；
- C. 如果不小心让外周血流入腹腔，可在贴壁 5 h 后，用 1×PBS 缓冲液多漂洗几次细胞培养皿，去除红细胞的干扰。

人外周血单个核细胞 (PBMCs) 样本

1.1 密度梯度离心法

- (1) 用含肝素或 EDTA 的抗凝管收集全血样本，等体积向血液样本中添加 1×PBS 缓冲液 (PR20014) 进行稀释。
- (2) 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 淋巴细胞分离液 (一般是密度梯度分离液：利用细胞之间的密度差异从而达到分离的目的，如 Ficoll)，之后将稀释后的血液样本小心缓慢铺到分离液上面。
- (3) 密度梯度离心：将离心机的升降速均调到最低，室温 875×g 离心 20 min。
- (4) 离心结束后，小心吸取 PBMCs 层 (如下图)，加入 10 mL 1×PBS 缓冲液，4°C 875×g 离心 5 min。



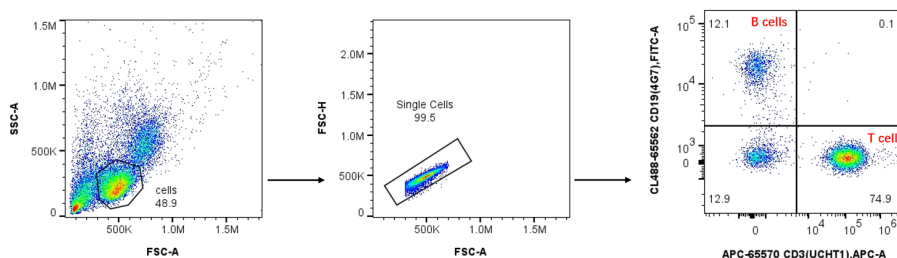
▲ 人外周血离心后示意图

- (5) 弃掉上清，加入 5 mL 1×PBS 缓冲液重悬细胞，4°C 875×g 离心 5 min (进一步去除残留的血小板、血浆蛋白和淋巴细胞分离液)。
- (6) 弃掉上清，加入 1×流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个 / mL。
- (7) 在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 细胞悬液，再加入 1 μ L MonoZero™ 人 Fc 受体封闭剂 (PF00032)，轻轻混匀后于室温孵育 10 min 后加入适量流式抗体，继续孵育 35 min。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

- (8) 孵育结束后，用 1×流式细胞染色缓冲液洗涤两次，离心弃上清，重悬细胞后进行检测。

▼ 人 PBMCs 中 T/B 细胞流式染色分析数据



- ① 通过 FSC-A/SSC-A 圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ② 用 FSC-A/FSC-H 去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③ 圈出 T 细胞 (CD3+CD19-) 与 B 细胞 (CD3-CD19+) (图右)。

使用抗体：
 Anti-Human CD19 (4G7) (货号：CL488-65562)
 Anti-Human CD3 (UCHT1) (货号：APC-65570)

注意事项

- A. 稀释后的血液样本与淋巴细胞分离液的比例为 1:1，如使用 10 mL 稀释后的血液样本，则需要加入 10 mL 的淋巴细胞分离液，并且淋巴细胞分离液需要恢复室温再使用；
- B. 可以使用巴斯德吸管将稀释后的血液样本沿着管壁慢慢添加到淋巴细胞分离液上面，尽量保持液面平整，形成清晰的分层，这一步非常关键；
- C. 密度梯度离心时，离心机的升降速必须调到最低，避免快速升速或降速导致细胞层混合，影响分离的效果；
- D. 在吸取 PBMCs 时，吸管尖端沿着 PBMCs 层的上方液面缓慢移动，从上往下吸取，尽量避免吸取到上层的血浆和下层的淋巴细胞分离液以及底层的红细胞和粒细胞，可以多次少量吸取，提高 PBMCs 的纯度；
- E. 血液样本在离体 2 h 内处理最佳。

1.2 红细胞裂解法

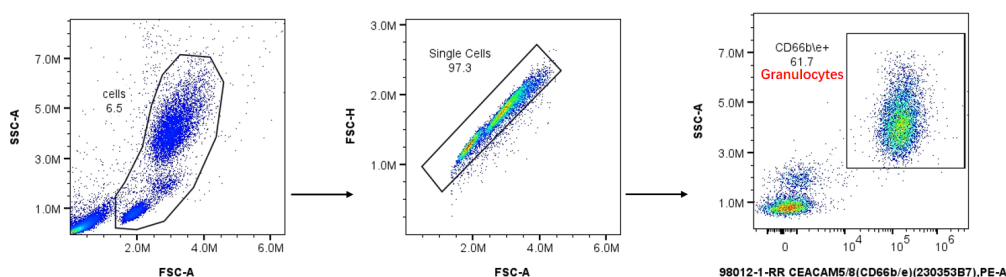
该方法操作与其他样本不同，外周血先流式染色再进行后续处理。

- (1) 抗凝血先用生理盐水（0.9% 氯化钠水溶液）进行稀释，在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 稀释后的抗凝血。
- (2) 按推荐比例（1.0 μ L / 100 μ L 细胞悬液）加入 1 μ L MonoZero™ 人 Fc 受体封闭剂（PF00032），室温孵育 10 min。

使用 FcZero-rAb® 系列 Fc 沉默重组流式抗体，从根源消除 Fc 受体造成的假阳性，可不再使用 Fc 受体封闭剂，简化实验操作，有效降低实验成本。

- (3) 加入流式抗体，室温避光孵育 35 min。
- (4) 每管加入 2 mL 1 \times 红细胞裂解液（PF00015）重悬细胞，37 $^{\circ}$ C 裂解 12 min，4 $^{\circ}$ C 382 \times g 离心 5 min。
- (5) 每管加入 2 mL 1 \times 流式细胞染色缓冲液（PF00018）重悬细胞，4 $^{\circ}$ C 382 \times g 离心 5 min。
- (6) 每管加入 200 μ L 1 \times 流式细胞染色缓冲液重悬细胞，上机检测。

▼ 人外周血粒细胞流式染色数据分析



- ① 通过 FSC-A/SSC-A 圈出淋巴细胞主群（图左）；
- ② 用 FSC-A/FSC-H 去除粘连体信号，分析单细胞（图中）；
- ③ 圈出粒细胞（CD66b/e+）（图右）。

使用抗体：
Anti-Human CEACAM5/8 (CD66b/e) (货号：98012-1-RR)

注意事项

- A. 裂红时需要在 37 $^{\circ}$ C 的环境下进行，这样可以使红细胞裂解充分；
- B. 如果是检测红细胞表面标志物，则不需要裂解红细胞，并且外周血需要稀释 20 倍左右再进行抗体孵育。

密度梯度离心法和红细胞裂解法对比

方法	优点	缺点	应用
密度梯度离心法	有效去除杂细胞，且不会损伤目的细胞在后续实验中的性能	耗时长，需要细致和专业的操作	常用于分选、细胞功能实验
红细胞裂解法	去除红细胞简便易行，既不损伤目的细胞又能充分的去除红细胞	裂解后红细胞碎片较多，不易去除	用于分析白细胞或中性粒细胞

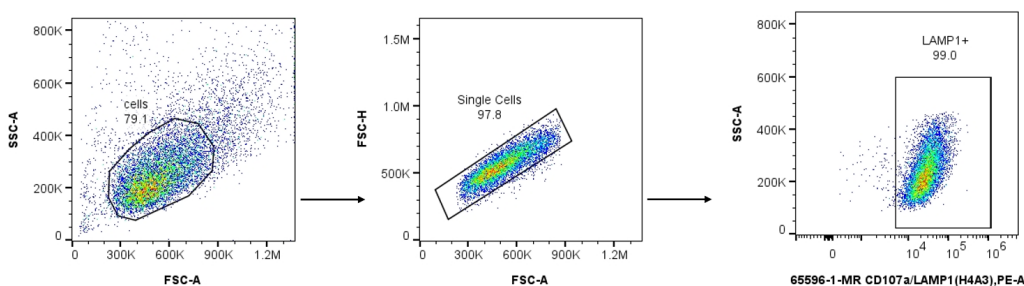
Proteintech 提供多种类型红细胞裂解液，适用不同实验需求。

功能	产品名称	货号	优势
红细胞裂解液	红细胞裂解液（无菌即用型）	PR30017	✓ 适用于人、兔、小鼠、大鼠 ✓ 白细胞无损
	红细胞裂解液（10X，不含固定剂）	PF00014	
	红细胞裂解液（1X，即用型、含固定剂）	PF00015	

悬浮细胞系样本

- (1) 在超净台中，用移液器轻轻吹打混匀，使细胞完全分散，将细胞悬液收集于 15 mL 离心管中，4°C 315×g 离心 5 min。
- (2) 弃掉上清，加入 5 mL 1× 流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，4°C 315×g 离心 5 min。
- (3) 弃掉上清，加入 1× 流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个/mL。
- (4) 在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 细胞悬液，进行流式染色。

▼Jurkat细胞流式染色数据分析



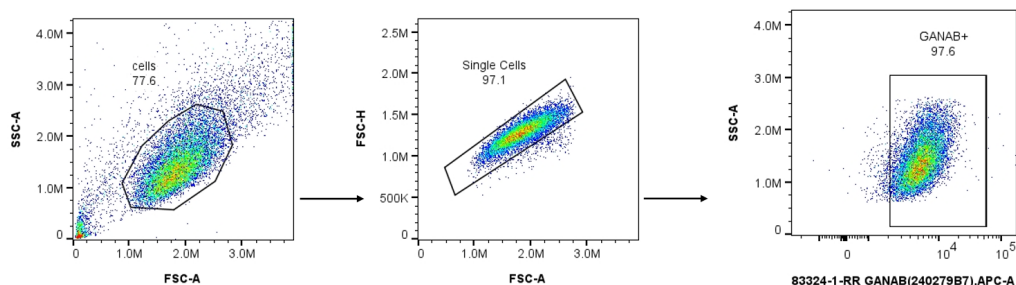
- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③圈出Jurkat细胞 (CD107a+) (图右)。

使用抗体：
Anti-Human CD107a / LAMP1 (H4A3) (货号：65596-1-MR)

贴壁细胞系样本

- (1) 在超净台中，弃掉原有培养基，加入适量无菌 1×PBS 缓冲液 (PR20014) 清洗一次。
- (2) 加入适量胰酶 (0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液, PR40021) 消化贴壁细胞，不同的贴壁细胞消化时间有所差异，一般在 37°C 消化 2 min 即可。(若不确定具体消化时间，可在显微镜下观察细胞形态，细胞由梭形变成圆形则消化完成。)
- (3) 加入细胞完全培养基终止消化，用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。
- (4) 将细胞悬液收集到 15 mL 离心管中，4°C 315×g 离心 5 min。
- (5) 弃掉上清，加入 5 mL 1× 流式细胞染色缓冲液 (PF00018) 重悬细胞，4°C 315×g 离心 5 min。
- (6) 弃掉上清，加入 1× 流式细胞染色缓冲液重悬细胞，计数，将细胞浓度调整至 1×10^7 个/mL。
- (7) 在 2 mL 离心管中加入 100 μ L 细胞悬液，进行流式染色。

▼HeLa细胞流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群 (图左)；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞 (图中)；
- ③圈出HeLa细胞 (GANAB+) (图右)。

使用抗体：
Anti-GANAB (货号：83324-1-RR)

五、流式细胞术常规染色操作流程

流式细胞术实验中利用荧光素标记抗体，特异性结合细胞表面及胞内抗原分子，以此实现对不同细胞亚群的区分与鉴定。其中细胞表面抗原染色仅针对细胞膜表面蛋白，抗体可直接结合靶标，无需对细胞进行固定与透化处理。而胞内抗原检测则必须经过细胞固定、膜透化步骤，使抗体能够穿透细胞膜，结合胞内目标抗原。同时，加入死活细胞染料能够有效排除死细胞干扰，避免死细胞非特异性吸附抗体造成的假阳性结果。

一、细胞表面蛋白流式检测

1.试剂准备：

1. 流式细胞染色缓冲液（1X）（PF00018）
2. 死活细胞染料：7-AAD（PD00101）或 Phantom Dye（PD00001~ PD00009）
3. （可选）Fc 受体阻断剂：小鼠 Fc 受体封闭剂（PF00031，仅推荐在鼠源细胞上使用）
人 Fc 受体封闭剂（PF00032，仅推荐在人源细胞上使用）
人 / 小鼠三合一封闭剂（PF00029，可用于人 / 小鼠来源的细胞上使用）
4. 1X PBS 缓冲液（PR20014，使用前用无菌蒸馏水或无菌纯水稀释至 1X 工作液）
5. 流式抗体

2.操作流程：

方法一、选用Phantom Dye死活细胞鉴定染料

1. 收集细胞，进行细胞计数，用 1X PBS 洗涤细胞 2 次，每次 350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
2. 用 1X PBS 重悬细胞，调整细胞浓度为 $1-10 \times 10^6$ 个细胞 / mL，加入一种 Phantom Dye 死活细胞鉴定染料 染色，2-8° C 避光孵育 30 min。
3. 孵育结束后，用流式细胞术染色缓冲液洗涤 1-2 次，每次 350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
4. 用流式细胞术染色缓冲液重悬细胞，将 100 μ L 细胞悬液分装入进样管或上样孔中，每管大约 1×10^6 个细胞。
5. （可选）加入 Fc 受体阻断剂（5-20 min）。
6. 加入推荐用量的一抗，4° C 避光孵育 20-40 min。
7. 用流式细胞术染色缓冲液洗涤细胞，350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
注：如果使用荧光染料偶联的一抗，请跳至步骤11。
8. 用 100 μ L 稀释的荧光染料偶联二抗溶液重悬细胞，4° C 避光孵育 15-30 min。
9. 用流式细胞术染色缓冲液洗涤细胞，350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
10. 用 200-500 μ L 流式细胞术染色缓冲液重悬细胞并在流式细胞仪上分析。

方法二、选用7-AAD死活细胞鉴定染料

1. 收集细胞，进行细胞计数，用 1X PBS 洗涤细胞 2 次，每次 350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
2. 用流式细胞术染色缓冲液重悬细胞，将 100 μ L 细胞悬液分装入进样管或上样孔中，每管大约 1×10^6 个细胞。
3. （可选）加入 Fc 受体阻断剂（5-20 min）。
4. 加入推荐用量的一抗，4° C 避光孵育 20-40 min。
5. 用流式细胞术染色缓冲液洗涤细胞，350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
注：如果使用荧光染料偶联的一抗，请跳至步骤8。
6. 用 100 μ L 稀释的荧光染料偶联二抗溶液重悬细胞，4° C 避光孵育 15-30 min。
7. 用流式细胞术染色缓冲液洗涤细胞，350-500 x g 离心 5 min，弃去上清。
8. 用 200-500 μ L 流式细胞术染色缓冲液重悬细胞，加入 5 μ L 7-AAD 死活细胞鉴定染料染色，2-8° C 避光孵育 5-10 min 后在流式细胞仪上分析。

二、细胞内蛋白流式检测

对一些细胞因子和转录因子等胞内存在的靶标进行染色，需要额外用到固定剂和通透剂。固定剂可以保持细胞的形态完整性，通透剂能够在膜表面形成小孔，便于流式抗体与胞内抗原的结合。

案例：流式检测人白细胞介素2（IL-2）

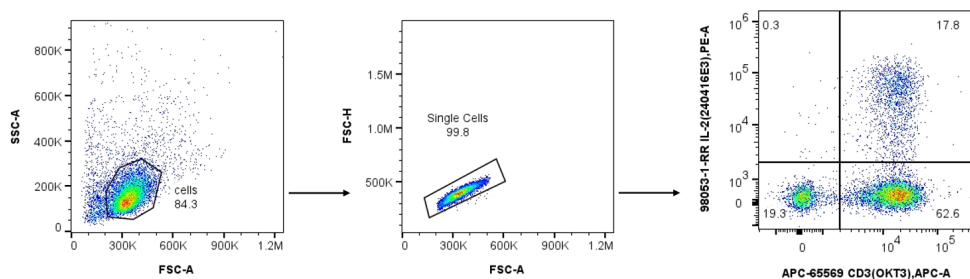
1.试剂准备：

1. 流式胞内固定破膜缓冲液试剂盒（PF00019，组分：PF00019-A、PF00019-B）；使用前用超纯水将流式细胞通透剂（PF00019-B）稀释至 1X 工作液。
2. Phantom Dye 死活细胞鉴定染料（PD00001-PD00009）
3. PBS 缓冲液（PR20014，使用前用无菌蒸馏水或无菌纯水稀释至 1X 工作液）
4. （可选）小鼠或人 Fc 受体封闭剂（PF00029/PF00031/PF00032）
5. （可选）单核细胞封闭剂（PF00020）
6. 流式抗体。

2.操作流程：

- (1) 人 PBMCs 经过合适的刺激条件产生 IL-2，收集刺激后的细胞，将浓度调整至 1×10^7 个/mL，以 100 μ L/test 分装到 2 mL 离心管中，加入一种 Phantom Dye 死活细胞鉴定染料标记活细胞，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。
- (2) 每管加入 2 mL 1 \times 流式细胞染色缓冲液，4 $^{\circ}$ C 382 \times g 离心 5 min。
- (3) 弃掉上清，每管加入 100 μ L 1 \times 流式细胞染色缓冲液重悬细胞，加入人 Fc 受体封闭剂，室温孵育 10 min。
- (4) 加入适量带荧光标记的细胞表面流式抗体至已完成 Fc 受体封闭的细胞悬液中，混匀，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 35 min。
- (5) 每管加入 2 mL 1 \times 流式细胞染色缓冲液，4 $^{\circ}$ C 382 \times g 离心 5 min。
- (6) 弃掉上清，每管加入 100 μ L 流式细胞固定剂，室温避光固定 15 min。
- (7) 4 $^{\circ}$ C 861 \times g 离心 5 min，弃掉上清，每管加入 1 mL 1 \times 流式细胞通透剂重悬细胞，洗去残余固定剂。
- (8) 4 $^{\circ}$ C 861 \times g 离心 5 min，弃掉上清，每管加入 100 μ L 1 \times 流式细胞通透剂重悬细胞，4 $^{\circ}$ C 避光通透 30 min。
- (9) 加入适量带荧光标记的细胞内流式抗体，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 35 min。
- (10) 每管加入 2 mL 1 \times 流式细胞通透剂，4 $^{\circ}$ C 861 \times g 离心 5 min。
- (11) 弃掉上清，每管加入 200 μ L 1 \times 流式细胞通透剂重悬细胞，上机检测。

▼人PBMCs IL-2流式染色数据分析



- ①通过FSC-A/SSC-A圈出淋巴细胞主群（图左）；
- ②用FSC-A/FSC-H去除粘连体信号，分析单细胞（图中）；
- ③分析T细胞（CD3+）群体中分泌IL-2的细胞比例（图右）。

使用抗体：
Anti-Human CD3 (OCT3)（货号：APC-65569）；
Anti-Human IL-2（货号：98053-1-RR）

三、转录因子流式检测

1.试剂准备:

1. Foxp3/ 转录因子流式固定破膜缓冲液试剂盒 (货号: PF00011, 组分: PF00011-A、PF00011-B、PF00011-C)。
2. (可选) Phantom Dye 死活细胞鉴定染料 (PD00001-PD00009)
3. 流式细胞染色缓冲液 (1X) (货号: PF00018)
4. PBS 缓冲液 (货号: PR20014, 使用前用无菌蒸馏水或无菌纯水稀释至 1X 工作液)
5. (可选) 小鼠或人 Fc 受体封闭剂 (货号: PF00029/PF00031/PF00032)
6. (可选) 单核细胞封闭剂 (货号: PF00020)
7. 流式抗体

2.操作流程:

1. 收集细胞并用 1X PBS 洗涤细胞 2 次, 每次 350-500 x g 离心 5min, 弃去上清。

2. (可选) 在固定步骤之前, 使用一种 Phantom Dye 死活细胞鉴定染料标记活细胞。

(可选) 使用推荐用量的荧光染料偶联一抗进行细胞表面染色, 染色结束后用 1 mL 流式细胞染色缓冲液洗涤细胞, 350-500 x g 离心 5 min, 弃去上清。

3. 洗涤后的细胞, 按每管 1×10^6 个细胞收集至 EP 管 (流式管) 中。加入 1 mL 1X Foxp3/ 转录因子固定 / 破膜液, 缓慢吹打以确保细胞完全重悬。室温下避光孵育 45 min。

4. 室温下 350-500 x g 离心 5 min, 弃去上清, 每管加入 2 mL 1X 流式细胞术破膜缓冲液, 缓慢吹打以确保细胞完全重悬, 350-500 x g 离心 5 min, 弃去上清。

5. 加入 100 μ L 1X 流式细胞术破膜缓冲液重悬细胞, 静置 10-15 min。

6. 加入推荐用量的一抗, 4°C 避光孵育 30-45 min, 用于检测细胞内抗原。

7. 用 2 mL 1X 流式细胞术破膜缓冲液洗涤细胞, 350-500 x g 离心 5 min, 弃去上清。重复该步骤。

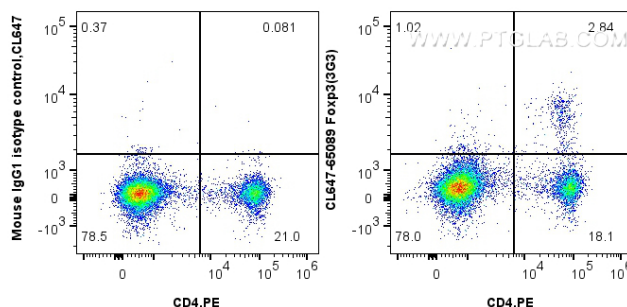
注: 如果使用荧光染料偶联的一抗, 请跳至步骤 10。

8. 用 100 μ L 1X 流式细胞术破膜缓冲液稀释的荧光染料偶联二抗溶液重悬细胞, 4°C 避光孵育 15-30 min。

9. 用 2 mL 1X 流式细胞术破膜缓冲液洗涤细胞, 350-500 x g 离心 5 min, 弃去上清。

10. 加入 200 μ L 1X 流式细胞术破膜缓冲液重悬细胞并在流式细胞仪上分析。

▼小鼠脾细胞



使用抗体:

Anti-Mouse Foxp3 (3G3) (货号: CL647-65089);

Anti-Mouse CD4 (GK1.5) (货号: CL488-65104);

Mouse IgG1同型对照抗体 (MOPC-21) (货号: CL647-65124)

四、磷酸化蛋白流式检测

1. 试剂准备：

1. 流式检测磷酸化蛋白固定通透试剂盒 (PF00026, 组分: PF00026-1、PF00026-2、PF00026-3); 使用前用超纯水将流式染色缓冲液 (10X) (PF00026-3) 稀释至 1X 工作液。
2. PBS 缓冲液 (PR20014, 使用前用无菌蒸馏水或无菌纯水稀释至 1X 工作液)
3. (可选) 小鼠或人 Fc 受体封闭剂 (PF00029/PF00031/PF00032)
4. (可选) 单核细胞封闭剂 (PF00020)
5. 流式抗体

2. 操作流程：(以p65、STAT3和AKT磷酸化蛋白流式检测为例)

1. 样本制备

用 100nm Calyculin A (CA, 花萼海绵体诱癌素 A, 一种蛋白磷酸酶抑制剂, 升高细胞内蛋白磷酸化水平) 处理处于对数生长期的人前列腺癌细胞 PC-3 (p65 磷酸化), 处理时间为 30 min。

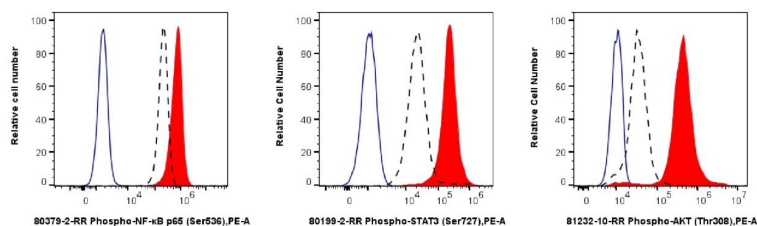
注: STAT3磷酸化用人胚胎肾细胞HEK-293T, Akt磷酸化用人宫颈癌细胞Hela。

2. 样本处理

- 1) CA 刺激后的细胞无需消化, 用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱落的细胞并收集到 50 mL 离心管中, 2000 rpm 离心 5 min。
 - 2) 弃掉上清, 加入 1×PBS 缓冲液洗涤的细胞, 按 1×10^6 个细胞收集至 EP 中。加入 0.5 mL 固定剂, 混匀后室温静置 15 min。350-500 xg 离心 5 min, 弃去上清。
 - 3) 使用前将通透剂冷却至 -20°C 。
 - 4) 加入 0.5 mL 预冷的通透剂, 混匀后室温静置 5 min。350-500xg 离心 5 min, 弃去上清。(使用移液器将细胞吹匀即可。)
 - 5) 加入 1.5 mL 染色缓冲液 1X。混匀后, 350-500 x g 离心 5min, 弃去上清。
 - 6) 重复步骤 5。
 - 7) 加入 0.1 mL 染色缓冲液 1X 重悬细胞。
 - 8) 加入推荐用量的一抗, 4°C 避光孵育 20-40 min。
 - 9) 孵育完成后, 加入 1.5 mL 染色缓冲液 1X 洗涤细胞, 350-500xg 离心 5min, 弃去上清。
 - 10) 10. 重复步骤 9。
- 注: 如果使用荧光染料偶联的一抗, 请跳至步骤14。
- 11) 使用染色缓冲液 1X 稀释二抗。加入 0.1 mL 稀释好的二抗, 混匀, 4°C 避光孵育 15-30 min。
 - 12) 孵育完成后, 加入 1.5 mL 染色缓冲液 1X 洗涤细胞, 350-500xg 离心 5 min, 弃去上清。
 - 13) 重复步骤 12。
 - 14) 加入 0.2 mL 染色缓冲液 1X 重悬细胞并在流式细胞仪上分析。

3. 结果分析：

磷酸化蛋白的表达水平通常用平均荧光强度 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) 来反应, 也就是下图中横坐标所表示的参数。通过叠加刺激组和未刺激组的荧光强度分布, 观察磷酸化信号的偏移。这三种细胞分别在 CA 刺激 30min 后, 其胞内的 p65 (Ser536)、STAT3 (Ser727) 和 Akt (Thr308) 信号都呈现出增强的趋势, 说明该处理是有效的并且流式细胞术很好的反应了这一变化。



▲ 蛋白磷酸化流式直方图

蓝线: 同型对照 黑色虚线: 未处理的细胞 红线: CA处理后的细胞。

注意事项

- A. 蛋白磷酸化信号可能瞬时出现 (如 5-30 min), 需要确定最佳的刺激时间。
- B. 蛋白磷酸化状态变化快, 收集细胞后需要立即固定, 以终止信号通路。

五、T细胞激活制备及流式检测

T细胞激活是指初始T细胞通过T细胞受体识别抗原呈递细胞表面的抗原-MHC复合物，并在共刺激信号作用下分化为效应T细胞的过程，从而发挥免疫应答功能。

1. 试剂准备：

1. 死活细胞鉴定染料 Phantom Dye Violet 510 (PD00005)
2. 流式细胞染色缓冲液 (1X) (PF00018)
3. PBS 缓冲液 (PR20014, 使用前用无菌蒸馏水或无菌纯水稀释至 1X 工作液)
4. (可选) 小鼠 Fc 受体封闭剂 (PF00029/PF00031) (若使用 FcZero-rAb® 重组流式抗体, 可不使用 Fc 受体封闭剂)
5. (可选) 单核细胞封闭剂 (PF00020)
6. 流式抗体及同型对照抗体

2. 样本制备：(以小鼠脾脏淋巴细胞为例, 介绍两种活化T细胞的操作步骤)

方法一：CD3/CD28 抗体活化 T 细胞：

1. 抗体包被 24 孔板

- 1) 在无菌 PBS 中制备 5-10 µg/mL anti-CD3 抗体 (FcA65651) 和 2-5 µg/mL anti-CD28 抗体 (FcA98195)。

注：建议进行预实验，确定 CD3 抗体和 CD28 抗体诱导 T 细胞活化的最佳浓度。CD28 抗体可以和 CD3 抗体一起包被，也可在后续添加细胞的时候加入。

- 2) 将 400 µL 抗体溶液分配到 24 孔板各孔中，37°C 孵育 2 h 或者 4°C 孵育过夜。
- 3) 将孔中的抗体溶液吸出，弃掉。
- 4) 用 1 mL 无菌 PBS 溶液冲洗每个孔并弃掉 (重复一次)。

2. 加入细胞悬液

- 1) 制备 RPMI 1640 完全培养基：添加 10% 的胎牛血清、1% 的青霉素 - 链霉素和 0.1% 的 β- 巯基乙醇。
- 2) 用 RPMI 1640 完全培养基将小鼠脾脏单细胞悬液的浓度调整至 $4-8 \times 10^5$ /mL。

注：建议滴定细胞培养浓度，以实现最佳激活状态。

- 3) 用无菌 PBS 清洗孔后 (上述步骤 4)，向每孔中加入 1 mL 细胞悬液。
- 4) 放入 37°C、5%CO₂ 培养箱中，孵育 2-4 天。

注：孵育时间需要根据具体的实验需求进行优化，并且要注意细胞状态和培养基颜色，及时更换新鲜培养基。

方法二：ConA 活化 T 细胞

1. 用 RPMI 1640 完全培养基 (如上) 将小鼠脾脏单细胞悬液的浓度调整至 1×10^6 /mL。根据使用的培养瓶大小 (T25 或 T75)，配制所需的体积。

2. 在细胞悬液中加入 ConA 溶液，具体工作浓度根据产品说明和实验需求来确定。

3. 将培养瓶放入 37°C、5%CO₂ 培养箱中，孵育 2-3 天。

3. 流式分析：(以 CD3/CD28 抗体包被方法刺激 T 细胞 2 天为例)

1. 设计逻辑

CD25 和 CD69 是 T 细胞激活过程中两个重要的表面标志物。CD25 是白细胞介素 -2 受体 (IL-2R) 的 α 链，在 T 细胞激活后 24-48 小时内上调表达，与 IL-2 结合后可促进 T 细胞的增殖分化，因此常用于评估 T 细胞的活化程度。

CD3 是 T 细胞标志物，可以将 T 细胞与其他细胞区分开来。CD4 主要是在辅助性 T 细胞上表达，CD8 是细胞毒性 T 细胞的标志物。通过 CD4 和 CD8 可将这两种 T 细胞亚群分开，并且通过 CD25 和 CD69 来分析这两种 T 细胞亚群的激活状态。

2. 配色方案 (FcZero-rAb® panel 系列)

靶点	荧光标记 (ex/em)	激光 (nm)	克隆号	货号	描述
CD3	APC-Cyanine7	633	17A2	AY7-FcA65659	T 细胞标志物
CD4	CoraLite® Plus 405	405	RM4-4	CL405-FcA65655	辅助性 T 细胞标志物
CD8	PE	488、532、561	242879C10	PE-FcA98472-2	细胞毒性 T 细胞标志物
CD25	APC	633	242494H5	APC-FcA98288	T 细胞活化标志物
CD69	CoraLite® Plus 488	488	250269C11	CL488-FcA98440	T 细胞活化标志物
同型对照抗体	和上述染料分别一致	和上述分别一致	240953C9	裸抗: FcA98136	同型对照
死活细胞鉴定染料	Phantom Dye Violet 510	405	-	PD00005	-

3. 样本管设置

Blank管	单染管	FMO (荧光减一) 管					同型对照管	全染管
		CD3 FMO	CD4 FMO	CD8 FMO	CD25 FMO	CD69 FMO		
空白细胞	AY7-CD3		AY7-CD3	AY7-CD3	AY7-CD3	AY7-CD3	AY7-Rabbit IgG	AY7-CD3
	CL405-CD4	CL405-CD4		CL405-CD4	CL405-CD4	CL405-CD4	CL405-Rabbit IgG	CL405-CD4
	PE-CD8	PE-CD8	PE-CD8		PE-CD8	PE-CD8	PE-Rabbit IgG	PE-CD8
	CL647-CD25	CL647-CD25	CL647-CD25	CL647-CD25		CL647-CD25	CL647-Rabbit IgG	CL647-CD25
	CL488-CD69	CL488-CD69	CL488-CD69	CL488-CD69	CL488-CD69		CL488-Rabbit IgG	CL488-CD69
	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510	Phantom Dye Violet 510

4. 实验步骤

1) 收集细胞，用流式细胞染色缓冲液将细胞浓度调整至 1×10^7 /mL，染色体系为 100 μ L/test (1×10^6 个细胞)。

2) 每 test 按照 1 : 1000 的比例加入死活细胞鉴定染料 Phantom Dye Violet 510，4°C避光孵育 30 min。

注：可以将所有需要染死活染料的细胞一起孵育死活染料，再进行分装，这样可以减小每个染色体系染料使用的误差。

3) 孵育结束后，每 test 加入流式细胞染色缓冲液，2000 rpm 4 °C离心 5 min。（此步骤重复一次）

4) 弃掉上清，每 test 加入 100 μ L 流式细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀。

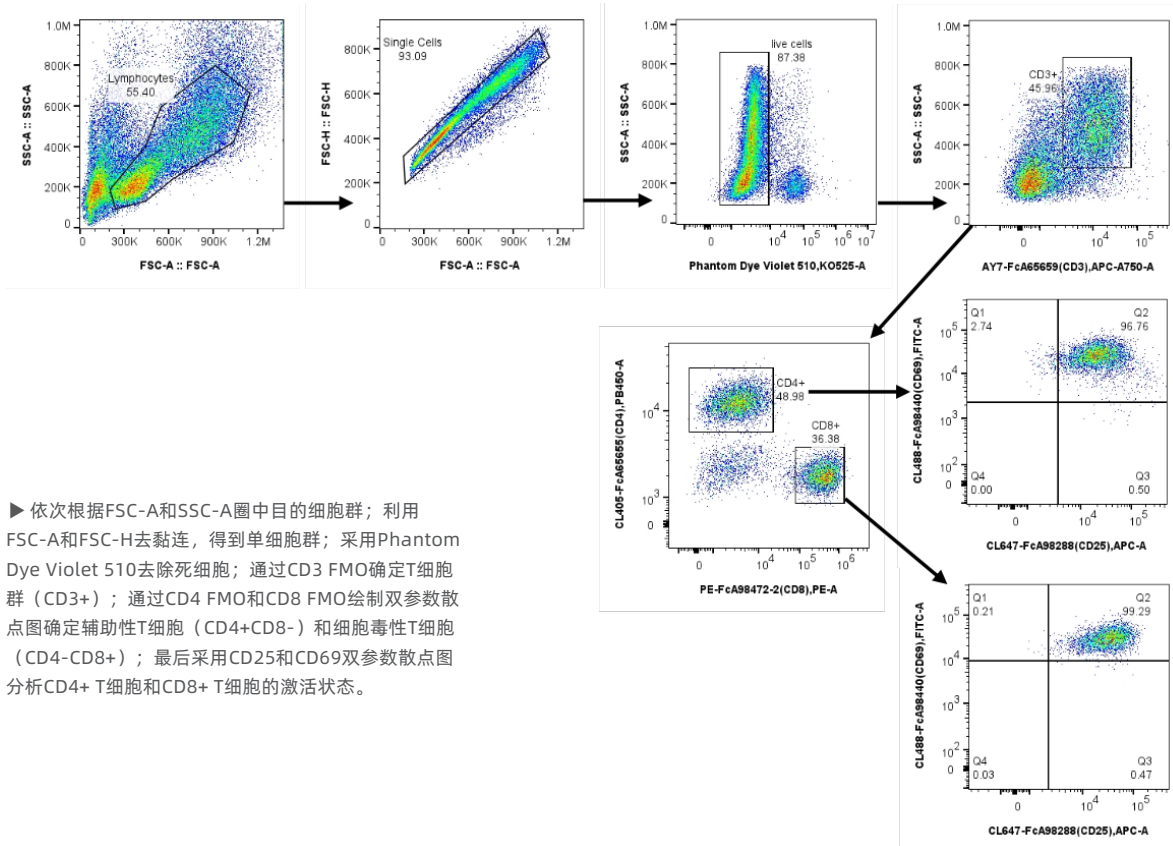
5) Fc 受体封闭：若使用的是 FcZero-rAb® 系列流式抗体，此步骤可以跳过；如果使用常规流式抗体，则需要加入 0.5 μ g/test 的 MonoZero™ 小鼠 Fc 受体封闭剂 (PF00031)，室温孵育 10 min。

6) 流式抗体孵育：blank 管不加抗体，各类样本管加入相对应的抗体，混匀，4°C避光孵育 35 min。

7) 孵育结束后，每 test 加入流式细胞染色缓冲液，2000 rpm 4°C离心 5 min。（此步骤重复一次）

8) 弃掉上清，每 test 加入 200 μ L 流式细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀，上机检测。

5. 数据分析



六、巨噬细胞极化及检测方案

巨噬细胞 (Macrophage) 是机体免疫系统的重要角色之一, 参与抵御、吞噬与清除病原体以及组织修复与愈合等过程。其最重要的特征是可塑性, 能够根据周围环境改变自身状态, 这一过程称为极化。巨噬细胞主要是两种状态的变化: M1 型和 M2 型。常见的巨噬细胞模型主要包含小鼠来源的 RAW264.7、J774A.1 和 BMDM (骨髓来源巨噬细胞) 以及人源的 THP-1 细胞等。

M1型和M2型巨噬细胞特点及差异

	M1 型 (经典激活)	M2 型 (替代激活)
类型	促炎型	抑炎型
主要诱导剂	LPS、IFN- γ 、GM-CSF	IL-4、IL-13、IL-10、TGF- β 、M-CSF
表面标志物	CD86、CD80	CD206、CD163
关键酶标志物	iNOS	Arg-1
分泌的细胞因子	促炎: TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-12 趋化: CXCL9、CXCL10	抑炎: IL-10、TGF- β 趋化: CCL17、CCL22、CCL24
主要功能	强力杀灭病原体、启动和放大炎症反应	抑制炎症、促进组织修复与伤口愈合

1. 试剂准备: (以RAW264.7诱导为M1、M2为例)

1. 极化实验

- 1) RAW264.7 细胞
- 2) DMEM 完全培养基、10% 热灭活 FBS、1% 青霉素 - 链霉素溶液 (PR40022)
- 3) M1 极化: 300ng/mL LPS (CM18556)、200ng/mL IFN- γ (Eg0334); M2 极化: 40ng/mL IL-4 (HZ-1004)、20ng/mL IL-10 (HZ-1145)、20ng/mL IL-13 (Eg0266)

2. 流式分析

- 1) Phantom Dye Red 780 死活细胞鉴定染料 (PD00002)
- 2) 流式细胞染色缓冲液 (1X) (PF00018)
- 3) (可选) 小鼠 Fc 受体封闭剂 (PF00029/PF00031) (若使用 FcZero-rAb[®] 重组流式抗体, 可不使用 Fc 受体封闭剂)
- 4) 流式抗体及同型对照抗体

2. 样本制备

1) 将处于对数生长期且状态良好的 RAW264.7 细胞的浓度用 DMEM 完全培养基 (DMEM+10% 热灭活 FBS+1% 青霉素 - 链霉素溶液) 调整至 1×10^5 /mL。在 6 孔板每孔中加入 3 mL 细胞悬液。

2) M1 极化实验组加入 300 ng/mL LPS、200 ng/mL IFN- γ ; M2 极化实验组加入 40 ng/mL IL-4、20 ng/mL IL-10、20 ng/mL IL-13。未作任何处理的 RAW264.7 细胞为 M0 组。

3) 在 37°C 5%CO₂ 的培养箱中培养 48 hours。

3. 流式分析

1. 设计逻辑

小鼠巨噬细胞基础亚群分析通过先检测 RAW264.7 (M0) 巨噬细胞以及诱导极化的 M1/M2 巨噬细胞上 CD45 以及 CD11b、F4/80 (小鼠巨噬细胞检测标志物) 的表达确认巨噬细胞群, 而后检测该群细胞上 CD86 和 CD206 的表达。

2. 配色方案 (FcZero-rAb[®] panel 系列)

靶点	荧光标记 (ex/em)	激光 (nm)	克隆号	货号	描述
CD45	CoraLite [®] Plus 405	405	240356D1	CL405-FcA98035	小鼠白细胞标志物
CD11b	CoraLite [®] Plus 594	561	M1/70	CL594-FcA65672	小鼠巨噬细胞标志物
F4/80	CoraLite [®] Plus 488	488	241959G4	CL488-FcA98236	小鼠巨噬细胞标志物
CD86	PE	488、532、561	230476B8	PE-FcA98025	小鼠 M1 巨噬细胞标志物
CD206	APC	633	240344D12	APC-FcA98031	小鼠 M2 巨噬细胞标志物
同型对照抗体	和上述染料分别一致	和上述分别一致	240953C9	裸抗: FcA98136	同型对照
死活细胞鉴定染料	Phantom Dye Red 780	633	-	PD00002	-

3. 样本管设置

M0、M1 和 M2 三种细胞分别按照下表设置样本管。

Blank管	单染管	FMO (荧光减一) 管					同型对照管	全染管
		CD45 FMO	CD11b FMO	F4/80 FMO	CD86 FMO	CD206 FMO		
空白细胞	CL405-CD45		CL405-CD45	CL405-CD45	CL405-CD45	CL405-CD45	CL405-Rabbit IgG	CL405-CD45
	CL594-CD11b	CL594-CD11b		CL594-CD11b	CL594-CD11b	CL594-CD11b	CL594-Rabbit IgG	CL594-CD11b
	CL488-F4/80	CL488-F4/80	CL488-F4/80		CL488-F4/80	CL488-F4/80	CL488-Rabbit IgG	CL488-F4/80
	PE-CD86	PE-CD86	PE-CD86	PE-CD86		PE-CD86	PE-Rabbit IgG	PE-CD86
	APC-CD206	APC-CD206	APC-CD206	APC-CD206	APC-CD206		APC-Rabbit IgG	APC-CD206
	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780	Phantom Dye Red 780

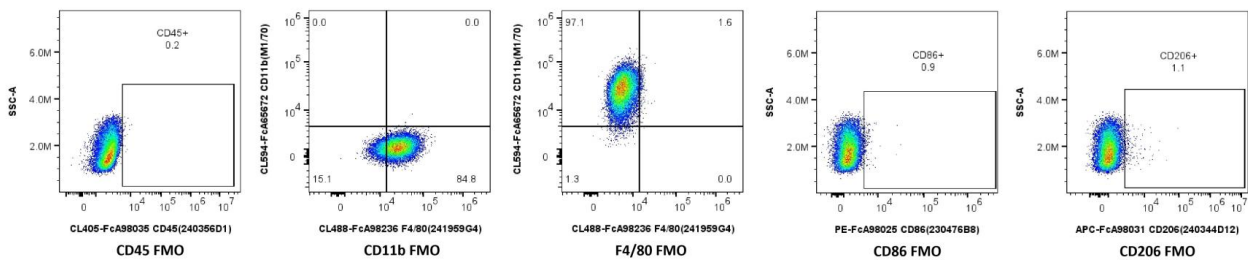
说明：Blank管：调节FSC和SSC电压，得到目的细胞群；单染管：调节各通道的电压以及荧光补偿；FMO(荧光减一)管：准确设定阳性门，扣除其他通道对目的通道的荧光溢漏影响；同型对照管：扣除抗体非特异性结合造成的背景染色对结果的影响；全染管：数据分析。

4. 实验步骤

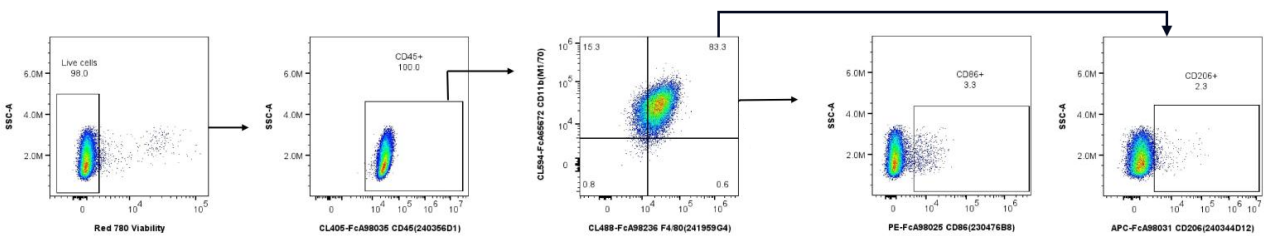
- 1) 弃掉每孔中的培养基，先用 PBS 缓冲液轻轻洗涤 1 次。再次加入 PBS 缓冲液，用细胞刮刀轻柔刮下细胞层并吹散，过 200 目滤网，制成单细胞悬液。
- 2) 将过滤后的细胞悬液转移至离心管中，2000 rpm 离心 5 min，弃掉上清；向离心管中加入 1× 流式细胞染色缓冲液，调整细胞浓度至 1×10^7 /mL，染色体系为 100 μ L/test (1×10^6 个细胞)。
- 3) 每 test 按照 1 : 1000 的比例加入死活细胞鉴定染料 Phantom Dye Red 780，4°C 避光孵育 30 min。
- 4) 孵育结束后，每 test 加入流式细胞染色缓冲液，2000 rpm 4°C 离心 5min。（此步骤重复一次）
- 5) 弃掉上清，每 test 加入 100 μ L 流式细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀。
- 6) Fc 受体封闭：若使用的是 FcZero-rAb® 系列重组流式抗体，此步骤可以跳过；如果使用常规流式抗体，则需要加入 0.5 μ g/test 的 MonoZero™ 小鼠 Fc 受体封闭剂，室温孵育 10 min。
- 7) 流式抗体孵育：按照上述表格，blank 管不加抗体，其他样本管加入相对应的抗体，混匀，4°C 避光孵育 35 min。
- 8) 孵育结束后，每 test 加入流式细胞染色缓冲液，2000 rpm 4°C 离心 5min。（此步骤重复一次）
- 9) 弃掉上清，每 test 加入 200 μ L 流式细胞染色缓冲液重悬细胞沉淀，上机检测。

5. 数据分析

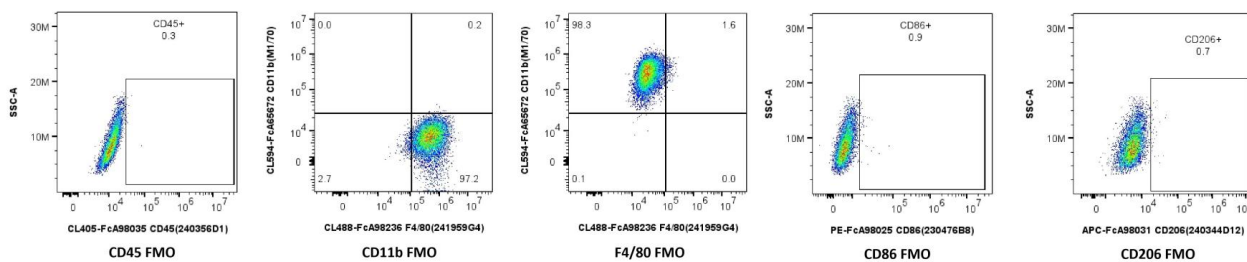
RAW264.7 极化为 M1 型巨噬细胞，与 M0 对比显示高表达 CD11b、F4/80 和 CD86（图 2、图 4）。M2 型巨噬细胞与 M0 相比 CD206 的表达明显升高（图 6），表明极化有效。



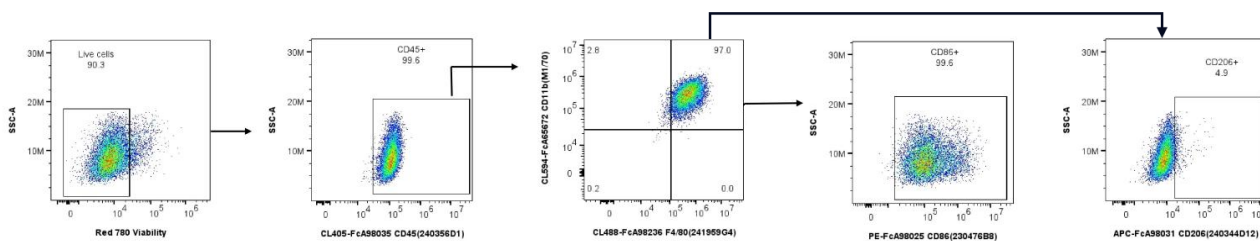
▲图1 M0圈门对照组



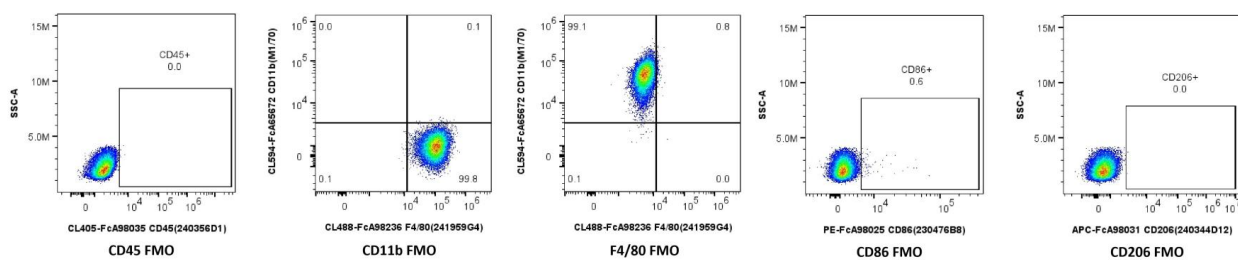
▲图2 M0圈门路径



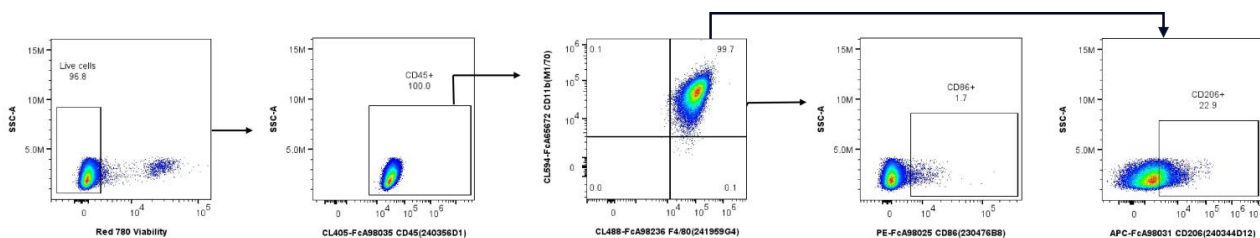
▲图3 M1圈门对照组



▲图4 M1圈门路径



▲图5 M2圈门对照组



▲图6 M2圈门路径

注意事项

- A. RAW264.7细胞代数不宜过高，高代数细胞会自发极化导致诱导效率下降，建议5到10代之间；细胞要保持良好的状态（呈圆形无伪足生成），在稳定传代后再进行极化实验，这一步是实验成败的关键。
- B. 极化实验所用的药物应该是较为新鲜的，避免使用存放时间过长或者反复冻融的药物，防止失效。
- C. 最后收集细胞时可用0.25%胰酶消化30s左右再用细胞刮刀轻柔刮下细胞层，能够减少细胞的机械损伤。胰酶消化时间不宜过长，会影响细胞表面抗原的状态，干扰检测。

Proteintech重组流抗覆盖常见免疫细胞标志物

20余种荧光染料灵活搭配 更多产品请登录官网查看

● FcZero-rAb® Fc沉默新型骨架重组流抗 ● Uni-rAb™ 传统骨架重组流抗

Anti-Human

细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
白细胞	CD45	241670E10	● FcA98117
造血干细胞	CD34	242069A6	● FcA98145-4
	CD38 (-)	241246F9	● FcA98148
B 细胞	CD19	241290B2	● FcA98126
	CD20	4G7	● FcA65562
T 细胞	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
活化 T 细胞	CD3	SP34	● FcA98319-2
	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
	CD3	SP34	● FcA98319-2
辅助性 T 细胞	CD25	240906E11	● FcA98469-4
	CD69	241552F1	● FcA98173
	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
Th1 细胞	CD3	SP34	● FcA98319-2
	CD4	OKT4	● FcA65603
	CD4	240427E12	● FcA98042
	CD3	UCHT1	● FcA65570
Th2 细胞	CD3	SP34	● FcA98319-2
	CD4	OKT4	● FcA65603
	CD4	240427E12	● FcA98042
	IL-4	240794E11	● FcA98138

细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
Th9/Th17/Th22 细胞	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
	CD3	SP34	● FcA98319-2
	CD4	OKT4	● FcA65603
调节性 T 细胞	CD4	240427E12	● FcA98042
	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
	CD3	SP34	● FcA98319-2
	CD4	OKT4	● FcA65603
	CD25	240906E11	● FcA98469-4
细胞毒性 T 细胞	CD127 (low/-)	240749H2	● FcA98074
	CD3	OKT3	● FcA65569
	CD3	UCHT1	● FcA65570
	CD3	SP34	● FcA98319-2
树突状细胞	CD8	SK1	● FcA65630
	CD1c	L161	● FcA65626
	CD83	HB15e	● FcA65581
	CD141	240365H3	● FcA98037-2
浆细胞样树突状细胞	CD209	240907A4	● FcA98156
	MHCclass II	L243	● FcA65560
自然杀伤细胞	CD123	241268E3	● FcA98107
	CD304	241812B11	● FcA98210
单核细胞	CD16	3G8	● FcA65612
	CD56	240078A7	● FcA98033
	CD14	26C	● FcA65616
	CD16	3G8	● FcA65612
巨噬细胞	CD64	10.1	● FcA65572
	CD14	26C	● FcA65616
	CD68	KP1	● FcA65593

细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
M1 型巨噬细胞	CD80	242913B11	● FcA98384
	CD86	BU63	● FcA65592
M2 型巨噬细胞	CD163	GHI/61	● FcA65561
	CD206	250381C1	● 98458-3
巨核细胞 / 血小板	CD42b	AK2	● FcA65588
	CD62p	AK4	● FcA65587
红细胞	CD235a	242822E1	● FcA98370-2
中性粒细胞	CD11b	ICRF44	● FcA65582
	CD15	252342A1	● FcA98616
	CD16	3G8	● FcA65612
嗜碱性粒细胞	CD117 (-)	241313C5	● 98377
	CD123	241268E3	● FcA98107
嗜酸性粒细胞	CD203c	242965D11	● 98490-2
	CD11b	ICRF44	● FcA65582
内皮细胞	Siglec-8	241275A5	● FcA98177
	CD31	WM-59	● FcA65614
	CD34	242069A6	● FcA98145-4
	CD105	241196D9	● FcA98013
间充质干细胞	CD144	240755B2	● FcA98071
	CD44	F10-44-2	● FcA65608
	CD73	AD2	● FcA65564
	CD90	241290B2	● FcA98126
	CD105	241196D9	● FcA98013
	CD11b (-)	ICRF44	● FcA65582
	CD14 (-)	26C	● FcA65616
	CD19 (-)	4G7	● FcA65562
	CD34 (-)	242069A6	● FcA98145-4
	CD45 (-)	241670E10	● FcA98117
	HLA-DR(-)	L243	● FcA65560

Anti-Mouse

细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
白细胞	CD45	240356D1	● FcA98035
造血干细胞	CD48 (-)	240732A5	● 98081
	CD150	242631G1	● FcA98348
B 细胞	CD117	240246C11	● FcA98041
T 细胞	CD19	242301C6	● FcA98287
活化 T 细胞	CD3	17A2	● FcA65659
	CD25	242494H5	● FcA98288
辅助性 T 细胞	CD69	250269C11	● FcA98440-2
	CD3	17A2	● FcA65659
Th1 细胞	CD4	GK1.5	● FcA65662
	CD4	RM4-4	● FcA65655
	CD4	RM4-4	● FcA65655
Th2 细胞	CD3	17A2	● FcA65659
	CD4	GK1.5	● FcA65662
Th9/Th17/Th22 细胞	CD4	RM4-4	● FcA65655
	IFN-γ	240262C9	● FcA98045

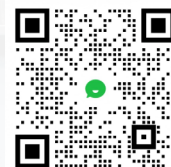
细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
Th17 细胞	CD3	17A2	● FcA65659
	CD4	GK1.5	● FcA65662
	CD4	RM4-4	● FcA65655
	IL-17	230038C7	● FcA98005
调节性 T 细胞	CD3	17A2	● FcA65659
	CD4	GK1.5	● FcA65662
	CD4	RM4-4	● FcA65655
	CD25	242494H5	● FcA98288
细胞毒性 T 细胞	CD3	17A2	● FcA65659
	CD8	242879C10	● FcA98472-2
树突状细胞	MHCclass II	M5/114.15.2	● FcA65663
	NKp46	29A1.4	● FcA65667
单核细胞	NKp46	241804A12	● FcA98198
	CD11b	M1/70	● FcA65672
	CD115	242213B1	● 98334-2
	Ly-6C	HK1.4	● 65669-1-TR
巨噬细胞	Ly-6G (-)	242141B11	● FcA98284
	CD11b	M1/70	● FcA65672
	F4/80	241959G4	● FcA98236
	CD68	230504G5	● FcA98029
M1 型巨噬细胞	CD80	241371E12	● FcA98158
	CD86	GL1	● FcA65673
M2 型巨噬细胞	CD206	240344D12	● FcA98031
	CD41	MWReg30	● FcA65674
巨核细胞 / 血小板	CD62p	240766F5	● 98302-2

细胞类型	靶标	克隆号	查询货号
中性粒细胞	CD11b	M1/70	● FcA65672
	Ly-6G	242141B11	● FcA98284
	CD115 (-)	242213B1	● 98334-2
嗜碱性粒细胞	Ly-6C (low/-)	HK1.4	● FcA65669
	FcεR1a	242008G6	● FcA98289
嗜酸性粒细胞	CD11b	M1/70	● FcA65672
	F4/80	241959G4	● FcA98236
内皮细胞	CD31	242041B5	● FcA98258
	CD34	240659B11	● FcA98069
	CD105	242305E7	● FcA98290
	CD144	241953D4	● FcA98251
间充质干细胞	CD44	242666F8	● FcA98359-2
	CD73	241541G9	● FcA98199
	CD90	30-H12	● FcA65656
	CD105	242305E7	● FcA98290
	CD11b (-)	M1/70	● FcA65672
	CD14 (-)	240225C2	● FcA98020
	CD19 (-)	242301C6	● FcA98287
	CD34 (-)	240659B11	● FcA98069
	CD45 (-)	240356D1	● FcA98035
		CD16	3G8



Proteintech 可提供专业的流式配色和数据分析服务

欢迎联系 Proteintech 流式技术咨询相关服务



扫码咨询流式技术支持



READING THE BOOK OF LIFE



WeChat Official Account

Proteintech Group, USA,
5400 Pearl Street, Suite 300,
Rosemont, IL 60018, USA
t. 1-888-478-4522
e. proteintech@ptglab.com

Proteintech Europe,
Manchester Science Park, Kilburn House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SE
t. (+44)-161-22-66-144
e. europe@ptglab.com

武汉三鹰生物技术有限公司
武汉市东湖开发区高新大道 666 号 D3-3
t. 027-87531637
e. Proteintech-CN@ptgcn.com